

онкологии, гематологии и иммунологии и зарегистрирована в Республике Беларусь.

Выводы.

1. Разработанная тест-система для определения количественной суммарной оценки транскриптов сурвивина может быть использована в онкологии и клинической медицине.

2. Применение тест-системы позволит расширить понимание роли сурвивина в онкогенезе и клеточной реакции на внешние раздражители, роли этого белка в ангиогенезе и пролиферации опухоли, что, в конечном счете, создаст возможность использования разработанного метода для оценки эффективности химиотерапии.

Литература:

1. Dallaglio, K. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin / K. Dallaglio, A. Marconi, C. Pincelli // J Invest Dermatol. - 2012. – 132 (1). - P. 18-27.

2. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics / A.C. Mita [et. al] // Clin Cancer Res. - 2008. – 14 (16). - P. 5000-5.

3. Novel survivin inhibitor YM155 elicits cytotoxicity in glioblastoma cell lines with normal or deficiency DNA-dependent protein kinase activity / P.C. Lai [et. al] // Pediatr Neonatol. - 2012. – 53 (3). - P. 199-204.

4. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo / P. Wang [et. al]. // Mol Carcinog. - 2012. – 51 (7). - P. 586-95.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ HER2/NEU ТРАНСКРИПТОВ

***Семенов В.М., Шляхтунов Е.А., Побяржин В.В., Субботина И.А.,
Пашинская Е.С., Егоров С.К., Семенов С.В.***

УО «Витебский государственный медицинский университет»

В настоящее время установлено, что белок HER-2/neu - трансмембранная рецепторная тирозинкиназа, экспрессируется преимущественно в эпителиальных клетках и кодируется геном, локализованным в 17q хромосоме. Основной особенностью рецепторных тирозинкиназ является их трансмембранная локализация и необходимость во взаимодействии с соответствующим лигандом (активирующим фактором), для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов.

Молекулярная масса рецептора HER-2/neu составляет 185 килодальтон (kDa), поэтому его также иногда называют белком p185. Молекула рецептора состоит из внутреннего тирозинкиназного домена, небольшой

трансмембранной части, а также из внеклеточного домена (ВКД), который подобен таковым и у других членов HER- семейства (2,4). Внеклеточная часть рецептора является высокогликолизированным белком с молекулярной массой от 97 до 115 kDa и определяется как в среде культивирования некоторых линий клеток рака молочной железы (РМЖ), так и в плазме или сыворотке [1] крови здоровых женщин, а также пациенток с РМЖ. В настоящее время механизм активации HER-2/neu не совсем понятен, но исследования показали, что рецепторы семейства HER образуют гомо- и гетеродимеры, в результате чего активируются внутренние тирозинкиназы и весь последующий каскад событий регулируемого ими сигнального пути [2,3]. Лиганд к рецептору HER-2/neu до сих пор не обнаружен. Однако его родственные рецепторы могут активироваться многочисленными лигандами, среди которых собственно эпидермальный фактор роста (ЭФР), а-трансформирующий фактор роста, амфирегулин и др., функцией которых является активация рецептора 1 типа - HER-1, а также семейство пептидных лигандов - неурегулинов с молекулярной массой около 45kDa, взаимодействующих преимущественно с рецепторами HER-3 и HER-4.

Наиболее широко используемой методом определения гиперэкспрессии белка HER-2/neu является иммуногистохимический [4], для определения числа копий или амплификации гена HER-2/neu используется метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (Fluorescent In Situ Hybridization - FISH). Стандартизированная система подсчета и интерпретации результатов иммуногистохимического анализа была разработана с помощью стандартных клеточных линий. В данной системе клетки, содержащие менее 20 000 рецепторов, не покажут никакого окрашивания (0); клетки, содержащие приблизительно 100 000 рецепторов, выявляются с частичным окрашиванием мембраны (менее чем у 10 % клеток (1+)); в клетках, содержащих около 500000 рецепторов, полное окрашивание будет наблюдаться в более чем 10% клеток (2+); полное и сильное окрашивание мембраны, больше чем у 10% клеток, показали бы клетки, содержащие приблизительно 2 300 000 рецепторов (3 +) [5].

Вторая методика, используемая для определения HER-2/neu статуса - это FISH анализ (флюоресцентная гибридизация *in situ*). Преимущества данной методики заключается в возможности определить амплификацию или количество копий гена, кодирующего рецептор HER-2/neu.

Третий метод, используемый для определения статуса HER-2/neu – это иммуноферментный метод (ELISA). Он может использоваться для количественного определения всего белка p185 в опухоли или его циркулирующего растворимого фрагмента в плазме, или сыворотке крови.

Используя моноклональные антитела, направленные на ВКД HER-2, было установлено, что фрагмент рецептора HER-2/neu мигрировал во внеклеточную среду [5]. В последние несколько лет описано множество иммуноферментных методик, используемых для определения ВКД в плазме и сыворотке больных РМЖ и контрольных группах здоровых женщин.

В тоже время отсутствие стандартизации методов затрудняет сравнение результатов, полученных разными авторами.

Цель исследования. Создание тест-системы для количественного определения транскриптов HER-2/neu методом совмещенных реакций обратной транскрипции и ПЦР (ОТ-ПЦР) в различном клеточном и клиническом материале.

Материал и методы. Разработку праймеров и зондов для ОТ-ПЦР проводили с использованием *in silico* анализа. Информацию о первичной структуре генов получали с использованием данных международных баз геномов <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.genome.tdb.org/>, [annotation/genome/tdb/](http://annotation.genome.tdb.org/), [Gene Index.html](http://www.geneindex.com/). Оценку конформации образуемых олигонуклеотидов и силу связи, температуру плавления вторичных структур осуществляли с использованием онлайн-программы <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold> и <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Праймеры и зонды для ОТ-ПЦР были подобраны с учетом структур экзонов и интронов. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур». Уровень экспрессии форм мРНК HER-2/neu измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов на основе математического анализа формы кривой амплификации. Уровень экспрессии фактически отражал представленность транскрипта в сравнении с нормировочным геном. В ходе исследования определяли пороговые циклы анализируемых проб.

Для количественного анализа создавали стандарты. К каждому стандарту конструировали соответствующий зонд. Делали 10-кратные разведения стандарта и проводили ПЦР в реальном времени с использованием данных разведений. После проведения ПЦР и построения калибровочной зависимости величины Ст от исходного количества копий стандартов (lgN) для каждого из стандартов создавалась возможность вычислить неизвестное исходное количество копий в анализируемых образцах с помощью интерполяции.

Результаты и обсуждение. В результате работы впервые в Республике Беларусь была создана тест-система для определения количественной суммарной оценки транскриптов HER2/NEU, включая все известные варианты сплайсинга в образцах РНК / мРНК.

Созданную тест-систему для количественного определения her2/neu транскриптов оценивали вместе с кДНК, полученной из мРНК HER2 / NEU, экспрессирующей клеточной линии SK-BR-3 (номер ATCC: HTB-30). Использовали стандарты в концентрации 10^5 , $2,5 \times 10^3$, 10^2 , 25 и 5 копий в пробирке. Результаты исследования представлены в таблице.

Таблица: Характеристика тест-системы для обнаружения транскриптов HER2/NEU

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая ДНК HER2/NEU	≥5 копий за пробег
Линейный диапазон	Синтетическая ДНК HER2/NEU	>5 логарифмов

Созданная тест-система прошла клинические испытания в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии и зарегистрирована в Республике Беларусь.

Литература

1. HER-2/neu as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel / Di Leo A [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. - 2004. - Vol. 86(3). - P.197-206.
2. Duffy, M.J. Predictive Markers in Breast and Other Cancers / M.J. Duffy // A Review Clin. Chem. - 2005. - Vol. 51(3).- P. 494-503.
3. Hayes, D.F. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker / D.F. Hayes, A.D. Thor // Semin. Oncol. - 2002. - Vol. 29. - P. 231-245.
4. Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer / M. Krainer [et al.] // Oncology. -1997. - Vol. 54 (6). - P. 475-481.
5. Nunes, R.A. The HER2 extracellular domain as a prognostic and predictive factor in breast cancer / R.A. Nunes, L.N. Harris // Clin. Breast Cancer. - 2002. - Vol. 3 (2). - P. 125-135.

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТЫ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ В АМБУЛАТОРНО- ПОЛИКЛИНИЧЕСКОМ ОТДЕЛЕНИИ УЗ «ВИТЕБСКИЙ ОБЛАСТНОЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ И КОСМЕТОЛОГИИ»

Спиридонов В.Е., Майстрёнок А.М.

УЗ «Витебский областной клинический центр дерматовенерологии
и косметологии»

Актуальность. Генитальный герпес относится к наиболее распространенным заболеваниям, передаваемым половым путем, и отличается от других болезней пожизненным носительством возбудителя в организме человека (латенцией). Социальный характер урогенитального герпеса определяется контагиозностью, рецидивирующим течением, нередко осложняющимся импотенцией и бесплодием, отмечается взаимосвязь генитального герпеса с раком шейки матки (потенцирует действие вируса папилломы человека), раком предстательной железы [1,2].

В УЗ «Витебский областной клинический центр дерматовенерологии и косметологии» с 2014 года открыт кабинет по диагностике, лечению и